

氏 名	武部 祐一郎
学 位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4725号
学位授与の日付	平成25年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	エナメル上皮腫における成長因子の発現と腫瘍間質の性状に関する検討
学位論文審査委員	滝川 正春 教授                      高木 慎 准教授 長塚 仁 教授

### 学位論文内容の要旨

#### [背景]

歯原性腫瘍は歯や歯周組織の発生過程に生じる組織に由来する腫瘍である。代表的な歯原性腫瘍であるエナメル上皮腫は、腫瘍実質として歯胚に類似した索状から小島状の腫瘍胞巣を形成し、胞巣の周囲には膠原線維からなる線維性間質が認められる。近年、間質は単に腫瘍実質を栄養するのみならず、実質に微小環境を提供し腫瘍の形態や性格に影響を及ぼす因子として注目されており、歯原性腫瘍においても腫瘍細胞が腫瘍間質に及ぼす影響を検討することは腫瘍の生物学的特性の理解において重要であると考えられる。しかし、これまでの研究では、主に腫瘍実質に着目した研究が中心で間質に着目した研究は少ない。そこで本研究では、エナメル上皮腫からの成長因子が間質に及ぼす影響および骨吸収への関与を明らかにすることを目的として免疫組織化学的に検討した。さらに、エナメル上皮腫手術材料からエナメル上皮腫間質細胞を初代培養し、in vitroでの検討も加えた。

#### [材料と方法]

岡山大学病院で取り扱ったエナメル上皮腫患者35例の組織材料を用い、H-E染色を行った。また、CCN2, BMP4, TGF $\beta$ , Ki-67, CD68, RANKLの各抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。エナメル上皮腫線維芽細胞の初代培養を行い、ASF0000, ASF0111の2種類の細胞を得た。これにエナメル上皮腫由来細胞株AM-1の培養上清を加え、エナメル上皮腫が産生する因子がASF細胞の増殖に与える影響をMTTアッセイで検討した。また、特に間質の性状変化に関連すると考えられたCCN2については、AM-1でのmRNAおよびタンパク発現を確認し、リコンビナントタンパクを加えた際のASF細胞への影響を検討した。

#### [結果]

組織学的にエナメル上皮腫組織を検討したところ、間質には線維の増生が強い部位と、浮腫状または粘液腫状を呈する部位が混在することが明らかとなった。前者の「腫瘍周囲に密な膠原線維の増生を伴い部位により硝子化を伴う」間質をFibrous type, 後者の「粘液腫状の形態で毛細血管に富む疎な結合組織からなる」間質をMyxoid typeとして分類し、各因子の発現を間質性状の差異に注目して検討した。

免疫組織化学的に、CCN2, BMP4, TGF  $\beta$  タンパクは胞巣辺縁部に位置する立方状ないし円柱状細胞、胞巣内部の星芒状細胞の細胞質に陽性を示した。CCN2発現は腫瘍の実質・間質ともにMyxoid typeと比べFibrous typeで陽性細胞が多かった。実質ではBMP4, TGF  $\beta$  の発現パターンおよび陽性率に明瞭な差異は認められなかった。一方、間質でのBMP4, TGF  $\beta$  発現については、Fibrous typeに比べ、Myxoid typeでは紡錘形細胞に陽性像が認められた。RANKLは実質ではほとんど発現を認めなかったが、間質での発現は、Fibrous typeでは陽性を示す細胞が認められなかったのに対し、Myxoid typeでは間質内の類円形細胞に陽性像が散見された。CD68は、間質内の類円形細胞や骨表面の破骨細胞に陽性像が認められた。間質における陽性細胞数のカウントでは、Fibrous typeでは $18.95 \pm 11.89$ , Myxoid typeでは $28.26 \pm 13.06$ であり、有意に陽性細胞数が多かった ( $p < 0.01$ )。Ki-67 indexはFibrous typeの実質で $3.62 \pm 1.82$ を示し、間質では $3.85 \pm 0.01$ を示した。一方、Myxoid typeでは、実質で $0.67 \pm 2.05$ , 間質では $0.77 \pm 0.51$ であった。実質、間質いずれについても、Fibrous typeでのKi-67 indexは有意に高かった。(いずれも $p < 0.01$ )

In vitroの実験では、エナメル上皮腫の腫瘍細胞が産生する因子が間質の性状および増殖能に影響する可能性を検討した。AM-1細胞培養上清を、ASF0000, ASF0111の各細胞に10~50%の濃度で加えたところ、培養7日目では上清を加えたすべての群で細胞増殖が有意に増加していた。さらに、AM-1培養上清はASF細胞の形態を変化させ、濃度依存的に線維芽細胞の錯綜が強まり、細胞の増殖能が高くなる傾向を認めた。

免疫組織化学の結果から、CCN2が腫瘍間質に影響を及ぼす重要な因子と考えられた。そこで、AM-1での mRNAおよびタンパク発現をRT-PCR, ウェスタンブロッティングで確認するとともに、リコンビナント CCN2タンパク (rhCCN2) をASF0000, ASF0111の各細胞に加え、MTTアッセイを行った。ASF0000, ASF0111のいずれの細胞でもrhCCN2を加えた群では培養7日目で有意に細胞増殖が増加した。

#### [考察および結論]

免疫組織化学的に、エナメル上皮腫では CCN2, BMP4, TGF  $\beta$  などの因子が発現しており、これらの発現の差異が間質の性状に影響を与える可能性が示唆された。特に実質・間質ともに Fibrous type で発現が高かった CCN2 は重要と考えられた。In vitro の検討でも、AM-1 細胞培養上清は、ASF 細胞の増殖を増強し、細胞形態を変化させた。また、CCN2 単独でも ASF 細胞の増殖能の増加が認められ、免疫組織化学的検討の結果が支持された。以上から、エナメル上皮腫では、腫瘍細胞が産生する CCN2 により、間質の性状が変化する可能性が示唆された。また、腫瘍実質の産生する CCN2 による間質性状変化は、間質からの BMP4, TGF- $\beta$ , RANKL 発現に影響を与え、間質の腫瘍微少環境を調整し、骨内において腫瘍が増殖しやすい環境を提供していると考えられた。

## 学位論文審査結果の要旨

近年、腫瘍間質は微小環境を提供し腫瘍の形態や性格に影響を及ぼす因子として注目されている。歯原性腫瘍においても、腫瘍間質が腫瘍の生物学的特性に大きく寄与すると考えられるが、腫瘍間質に着目した研究は少ない。そこで本研究では、代表的な歯原性腫瘍であるエナメル上皮腫における、間質での成長因子の発現に着目して解析を行った。

エナメル上皮腫患者 35 例の組織材料を用い、CCN2, BMP4, TGF  $\beta$ , Ki-67, CD68, RANKL の免疫組織化学的検討を行った。In vitro の実験ではエナメル上皮腫間質線維芽細胞の初代培養を行い、ASF0000, ASF0111 の 2 種類の細胞を得た。これにエナメル上皮腫由来細胞株 AM-1 の培養上清を加え、エナメル上皮腫が産生する成長因子が ASF 細胞に与える影響を検討した。特に間質の性状変化に関連すると考えられた CCN2 に関しては、AM-1 での mRNA およびタンパク発現を確認し、リコンビナントタンパクを加えた際の ASF 細胞への影響を検討した。

エナメル上皮腫組織を組織学的に検討したところ、線維の増生が強い部位と浮腫状または粘液腫状を呈する部位の、異なる二種類の間質が存在していた。前者を“Fibrous type”，後者を“Myxoid type”と分類し、それぞれについて成長因子の発現を検討した。CCN2, BMP4, TGF  $\beta$  タンパクは胞巣辺縁部の立方状ないし円柱状細胞や胞巣内部の星芒状細胞の細胞質に陽性を示した。CCN2 発現は腫瘍の実質・間質ともに Myxoid type に比べ Fibrous type で陽性細胞が多かった。実質では BMP4, TGF  $\beta$  の発現パターンおよび陽性率に明瞭な差異は認めなかったが、間質の紡錘形細胞では Fibrous type に比べ、Myxoid type に陽性像を多く認めた。RANKL は実質ではほぼ発現を認めなかったが、間質では Myxoid type の類円形細胞に陽性像が散見された。CD68 は、間質内の類円形細胞や破骨細胞に陽性像が認められ、Myxoid type で有意に陽性細胞数が多かった。Ki-67 Labeling index は実質、間質いずれにおいても Fibrous type で有意に高かった。In vitro の実験では、AM-1 細胞培養上清を、ASF0000, ASF0111 の各細胞に加え ASF 細胞への影響を検討したところ、上清を加えた群で細胞増殖が有意に増加し、線維芽細胞の錯綜を強める傾向を認めた。以上の結果から、CCN2 が腫瘍間質に影響を及ぼす重要な因子と考えられた。そこで、AM-1 での CCN2 の mRNA およびタンパク発現を確認した後、リコンビナントタンパク (rhCCN2) を ASF0000, ASF0111 の各細胞に加え ASF 細胞への影響を検討したところ、rhCCN2 を加えた群では有意に細胞増殖が増加した。

エナメル上皮腫では CCN2, BMP4, TGF  $\beta$  などの成長因子が発現しており、特に Fibrous type で発現が高かった CCN2 の差異が間質の性状に影響を与える可能性が示唆された。In vitro の検討でも、AM-1 細胞培養上清は ASF 細胞の増殖を増強し、細胞形態を変化させた。さらに、CCN2 単独でも ASF 細胞の増殖能の増加が認められた。以上の結果から、エナメル上皮腫では腫瘍細胞が産生する CCN2 により、間質の性状が変化し、間接的に間質からの BMP4, TGF- $\beta$ , RANKL 発現に影響を与えていると考えられた。これにより、間質の腫瘍微小環境を調整し骨内で腫瘍が増殖しやすい環境を提供している可能性が考えられた。

これらの知見は、エナメル上皮腫の生物学的特性の理解に貢献する基礎研究として価値の高い研究と考えられる。よって審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を有することを認めた。